

KRIOPRESERVASI TUNAS *IN VITRO* PEPAYA ‘SUKMA’ DENGAN PERLAKUAN PRAKULTUR, LOADING, DAN DEHIDRASI DENGAN PVS2 DAN MODIFIKASINYA

[Cryopreservation of *In Vitro* Papaya ‘Sukma’ Shoots through Preculture, Loading, and Dehydration with PVS2 and Its Modification]

Fitri Fatma Wardani^{1*}✉, Darda Efendi², Diny Dinarti², dan Joko Ridho Witono¹

¹

Pusat Penelitian Konservasi Tumbuhan dan Kebun Raya-Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia, Jl. Ir. H. Juanda 13, Bogor, Jawa Barat

²

Departemen Agronomi dan Hortikultura, Fakultas Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Kampus IPB Darmaga, Dramaga, Bogor, Jawa Barat
e-mail: fitrifatmawardani@gmail.com

ABSTRACT

Papaya has high genetic variability because it is an open-pollinated plant and has genotype and phenotype that are easily changed due to environment changes. Cryopreservation is a storing method of germplasm in liquid nitrogen (-196 °C) which can maintain the genotype and phenotype of germplasm. The experiment aimed to obtain the best preculture, loading, and dehydration for cryopreservation of papaya ‘Sukma’ *in vitro* shoots. For preculture, we planted shoots on MS media with 0.3 M and 0.4 M sucrose for 1, 2, and 3 days. In the loading treatment, we immersed shoots in loading solution (liquid MS+1.2M glycerol+0.4M sucrose) for 0, 10, 20, and 30 minutes. For dehydration, we immersed shoots in cryoprotectant (PVS2 and its modification) for 5, 10, and 15 minutes. Then, shoots were immersed in liquid nitrogen. The results showed that shoots had the best survival rate while they had been precultured on MS medium with 0.3 M sucrose for 3 days. The best loading treatment time was 20–30 minutes. The best dehydration treatment was obtained by modification of PVS2 for 10 minutes. The shoots have not been able to recovery after cryopreservation, so it can be concluded that cryopreservation of *in vitro* papaya ‘Sukma’ shoots has not been successful.

Keywords: liquid nitrogen, long-term storage, vitrification

ABSTRAK

Pepaya memiliki keragaman genetik yang tinggi karena merupakan tanaman yang menyerbuk terbuka serta memiliki genotipe dan fenotipe yang mudah sekali berubah akibat perubahan lingkungan. Kriopreservasi merupakan metode penyimpanan plasma nutfah di dalam nitrogen cair (-196 °C) yang dapat mempertahankan genotipe dan fenotipe plasma nutfah. Tujuan penelitian adalah mendapatkan perlakuan prakultur, *loading*, dan dehidrasi terbaik untuk kriopreservasi tunas *in vitro* pepaya ‘Sukma’. Pada perlakuan prakultur, tunas ditanam pada MS dengan sukrosa 0,3 M dan 0,4 M selama 1, 2, dan 3 hari. Pada perlakuan *loading*, tunas direndam dalam larutan *loading* (MS + gliserol 1,2 M + sukrosa 0,4M) selama 0, 10, 20, dan 30 menit. Pada perlakuan dehidrasi, tunas direndam dalam krioprotektan (PVS2 dan modifikasi PVS2) selama 5, 10, dan 15 menit. Tunas kemudian dimasukkan ke dalam nitrogen cair. Hasil menunjukkan bahwa perlakuan prakultur terbaik adalah tunas yang ditanam pada media MS dengan sukrosa 0,3 M selama 3 hari. Lama perlakuan *loading* terbaik yaitu 20–30 menit. Perlakuan dehidrasi terbaik yaitu perendaman tunas pada modifikasi PVS2 selama 10 menit. Tunas belum mampu tumbuh kembali setelah kriopreservasi sehingga dapat disimpulkan bahwa kriopreservasi tunas *in vitro* pepaya belum berhasil.

Kata kunci: nitrogen cair, penyimpanan jangka panjang, vitrifikasi

PENDAHULUAN

Pepaya merupakan salah satu buah tropis yang banyak digemari oleh masyarakat Indonesia karena memiliki kandungan gizi yang cukup banyak dan harganya relatif murah (Nwofia *et al.*, 2012). Pepaya dapat tumbuh dimana saja sehingga dengan berbagai varietas dapat ditemui di setiap daerah di Indonesia (Hervani *et al.*, 2016). Pepaya juga merupakan tanaman menyerbuk terbuka sehingga mudah sekali terjadi kawin silang yang menyebabkan informasi genetiknya mudah berubah (Al-Shara *et al.*, 2018). Oleh karena itu, penyimpanan pepaya dari berbagai varietas perlu

dilakukan agar informasi genetik dari varietas tersebut dapat dipertahankan sebagai sumber gen untuk pemuliaan pepaya di masa yang akan datang. Salah satu metode penyimpanan yang dapat digunakan adalah kriopreservasi. Kriopreservasi adalah metode penyimpanan bahan tanaman di dalam nitrogen cair (-196 °C) yang secara efisien dapat menghentikan metabolisme sel dan secara teori dapat menyimpan bahan tanaman dalam waktu yang tidak terbatas, tanpa mengalami perubahan informasi genetik (Pritchard *et al.* 2017).

Salah satu metode kriopreservasi yang saat ini banyak digunakan adalah vitrifikasi (Wang *et al.*,

*Kontributor Utama

*Diterima: 23 Oktober 2020 - Diperbaiki: 15 Februari 2021 - Disetujui: 7 Juni 2021

2005). Vitrifikasi adalah proses transisi wujud air dari fase cair menjadi fase *amorphous* atau kaca untuk menghindari pembentukan kristal es selama penyimpanan dalam nitrogen cair (Elliot *et al.*, 2017). Pada metode vitrifikasi, digunakan larutan krioprotektan untuk menghindari terjadinya kerusakan biologi akibat pembekuan. Larutan krioprotektan merupakan laturan tinggi konsentrasi yang dapat meracuni jaringan tanaman apabila lama perendaman dan konsentrasi yang diberikan kurang tepat (Elliot *et al.*, 2017). Salah satu cara untuk meningkatkan toleransi sel tanaman terhadap krioprotektan adalah memberikan perlakuan prakultur dan *loading* pada bahan tanaman yang digunakan. Prakultur biasanya dilakukan dengan menanam bahan tanaman pada media dengan tinggi sukrosa (0,3–0,4 M) selama 1–3 hari (Normah *et al.*, 2019). Perlakuan *loading* pada bahan tanaman dilakukan dengan cara merendamnya pada larutan *loading* selama 10–20 menit. Larutan *loading* yang biasa digunakan adalah 2 M gliserol pada media MS dengan kandungan sukrosa 0,4 M (Wang *et al.*, 2005).

Salah satu varietas pepaya yang memiliki sifat unggul adalah Sukma (Sukabumi Manis). Varietas ini merupakan varietas pepaya dengan buah ukuran besar (lebih dari 1200 g) yang berasal dari seleksi pohon induk pilihan yang telah dibudidayakan oleh petani sejak lama di Desa Cibodas, Kecamatan Parung Kuda, Sukabumi (Keputusan Menteri Pertanian No. 509 Tahun 2009). Percobaan tentang kriopreservasi pepaya ‘Sukma’ telah dilaporkan oleh Hervani *et al.* (2018). Percobaan tersebut menyatakan bahwa tunas pepaya ‘Sukma’ yang direndam dalam krioprotektan PVS2 selama 10–40 menit, kemudian disimpan dalam nitrogen cair memiliki daya bertahan hidup yang rendah yaitu 0,0–2,1% saja. Wang *et al.* (2005) telah melakukan kriopreservasi tunas pepaya varietas lain dengan hasil tunas tersebut mampu tumbuh kembali dengan baik. Wang *et al.* (2005), melakukan kriopreservasi dengan melakukan perlakuan *loading* terlebih dahulu dan menggunakan krioprotektan modifikasi PVS2. Tunas berhasil membentuk tunas baru setelah ditanam pada media regenerasi selama 7 hari. Keberhasilan protokol yang digunakan Wang *et al.* (2005) ini diujikan pada tunas pepaya ‘Sukma’ agar memiliki daya bertahan hidup yang tetap tinggi. Tahapan kriopreservasi yang dapat diujikan adalah memberikan perlakuan prakultur dan *loading* sebelum dehidrasi serta menggunakan modifikasi PVS2 sebagai krioprotektan. Tujuan dari percobaan ini adalah mendapatkan perlakuan prakultur, perlakuan *loading*, dan perlakuan dehidrasi terbaik untuk kriopreservasi tunas *in vitro* pepaya ‘Sukma’.

BAHAN DAN CARA KERJA

Tempat dan waktu

Percobaan dilaksanakan di Laboratorium Kultur Jaringan Pusat Kajian Hortikultura Tropika (PKHT) IPB pada bulan September–Desember 2018.

Bahan penelitian

Pepaya yang digunakan adalah pepaya ‘Sukma’ yang merupakan varietas pepaya homisogous sempurna. Pepaya ‘Sukma’ telah dilepas pada tahun 2009 dengan SK No. 509/Kpts/SR.120/10/2009. Pepaya ‘Sukma’ langsung dipanen dari pertanaman pepaya di kebun percobaan IPB Pasir Kuda, Babakan Pasir Mas, Ciomas, Bogor. Benih pepaya diekstraksi secara manual dan dicekambahkan pada media dasar padat Murashige dan Skoog (MS) (1962) dengan sukrosa 30 g L⁻¹, agar 6,5 g L⁻¹, dan pH 5,8. Setelah 6–8 minggu, tunas diperbanyak pada media regenerasi yaitu MS dengan BA 1,5 mg L⁻¹ dan NAA 0,5 mg L⁻¹. Botol kultur disimpan pada ruang kultur dengan terang 16 jam dan gelap 8 jam, intensitas cahaya 1000±100 lux dengan lampu fluoresens putih dan suhu 22±2 °C.

Optimasi prakultur tunas pepaya ‘Sukma’

Tunas ditanam pada media MS padat dengan penambahan konsentrasi sukrosa tinggi (0,3 M dan 0,4 M) dalam waktu tertentu (1–3 hari). Setelah perlakuan prakultur, eksplan di pindah ke media regenerasi. Botol kultur disimpan pada ruang kultur dengan terang 16 jam dan gelap 8 jam, intensitas cahaya 1000±100 lux dengan lampu fluoresens putih, dan suhu 22±2 °C.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama adalah konsentrasi sukrosa pada media MS dengan dua taraf, yaitu 0,3 M dan 0,4 M. Faktor kedua adalah lama prakultur dengan tiga taraf, yaitu 1, 2, dan 3 hari. Jumlah perlakuan dalam percobaan adalah 6 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali sehingga terdapat 18 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang berisi 5 eksplan per botol kultur. Variabel yang diamati adalah persentase eksplan yang hidup, persentase eksplan yang mampu bertunas, persentase eksplan berkalus, dan jumlah daun pada tiap eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 4 minggu.

Optimasi lama perlakuan *Loading* tunas pepaya ‘Sukma’

Tunas diprakultur dengan menerapkan perlakuan prakultur yang terbaik berdasarkan percobaan sebelumnya. Selanjutnya, tunas di-*loading* dengan larutan, yaitu MS cair dengan penambahan gliserol 2 M dan sukrosa 0,4 M.

Setelah itu, tunas direndam dalam larutan *deloading*, yaitu MS cair dengan penambahan sukrosa 1,2 M selama 20 menit sebelum ditanam pada media regenerasi. Botol kultur disimpan pada ruang kultur dengan terang 16 jam dan gelap 8 jam, intensitas cahaya 1000 ± 100 lux dengan lampu fluoresens putih, dan suhu 22 ± 2 °C.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap satu faktor yaitu lama perendaman dalam larutan *loading* dengan empat taraf, yaitu 0 (kontrol), 10, 20, dan 30 menit. Perlakuan kontrol adalah eksplan yang diprakultur tanpa direndam dalam larutan *loading* dan langsung ditanam pada media regenerasi. Setiap perlakuan diulang 5 kali sehingga terdapat 20 satuan percobaan. Setiap satuan percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang berisi 5 eksplan per botol kultur. Variabel yang diamati adalah persentase eksplan yang hidup, jumlah tunas pada setiap eksplan, persentase eksplan berkalus, dan jumlah daun pada tiap eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 4 minggu.

Dehidrasi dan Pembekuan Tunas Pepaya ‘Sukma’ dalam Nitrogen Cair

Eksplan diprakultur dan di-*loading* dengan menggunakan perlakuan terbaik berdasarkan percobaan sebelumnya. Setelah itu, diberikan perlakuan dehidrasi dengan menggunakan 2 krioprotektan pada lama perendaman yang berbeda. Eksplan dibungkus aluminium foil dan dimasukkan kedalam mikrotub ukuran 2 ml serta dimasukkan kedalam nitrogen cair semalaman. Eksplan kemudian di-*thawing* pada suhu 35 °C selama 1 menit (Roostika *et al.* 2007) dan selanjutnya direndam dalam larutan *deloading* selama 20 menit sebelum dipindahkan ke media regenerasi. Botol kultur disimpan pada ruang kultur dengan terang 16 jam dan gelap 8 jam, intensitas cahaya 1000 ± 100 lux dengan lampu fluoresens putih, dan suhu 22 ± 2 °C.

Rancangan percobaan yang digunakan adalah rancangan acak lengkap faktorial. Faktor pertama yaitu jenis krioprotektan dengan dua taraf yaitu, PVS2 (30% gliserol, 15% etilenglikol, dan 15% DMSO pada media MS dengan kandungan sukrosa 0,4 M) (Sakai *et al.* 1991) dan modifikasi PVS2 (3% [w/v] polietilenglikol, 0,02 M prolin, 20 % [v/v] gliserol, 13,6% [v/v] etilenglikol, dan 10% [v/v] DMSO pada media MS dengan kandungan sukrosa 0,4 M) (Wang *et al.* 2005). Faktor kedua yaitu lama perendaman dalam krioprotektan dengan tiga taraf, yaitu 5, 10, dan 15 menit (Roostika *et al.* 2007). Jumlah perlakuan dalam percobaan ini adalah 6 perlakuan dan diulang 3 kali sehingga jumlah satuan percobaannya adalah 18. Setiap satuan percobaan terdiri dari 3 botol kultur yang berisi 4 eksplan per botol kultur. Kontrol disiapkan dengan memberikan eksplan perlakuan prakultur, *loading*, dan

dehidrasi yang sama tanpa disimpan dalam nitrogen cair. Eksplan kemudian ditanam pada media regenerasi. Variabel yang diamati adalah persentase eksplan yang hidup, jumlah tunas pada setiap eksplan, persentase eksplan erkalus, dan jumlah daun pada tiap eksplan. Pengamatan dilakukan setiap minggu sekali selama 4 minggu.

Analisis Data

Data yang diperoleh dalam setiap pengamatan diolah dengan menggunakan program *Microsoft Excel 2016* dan di analisis keragamannya (*ANOVA*) ($\alpha = 5\%$) dengan program *Statistical Analysis Software (SAS)* versi 9. Hasil *ANOVA* yang berbeda nyata kemudian diuji lanjut *Duncan’s Multiple Range Test (DMRT)*.

HASIL

Optimasi Perlakuan Prakultur Tunas Pepaya ‘Sukma’

Percobaan prakultur menunjukkan bahwa pada minggu pertama, lama prakultur berpengaruh nyata terhadap persentase eksplan berkalus dan jumlah daun, sedangkan interaksi antara konsentrasi sukrosa dan lama prakultur berpengaruh nyata terhadap persentase eksplan berkalus saja. Pada minggu kedua, faktor konsentrasi sukrosa berpengaruh nyata terhadap persentase eksplan bertunas, faktor lama prakultur berpengaruh nyata terhadap persentase eksplan berkalus, dan interaksi kedua faktor tersebut berpengaruh nyata terhadap jumlah daun. Pada minggu ketiga, faktor lama prakultur berpengaruh nyata terhadap persentase eksplan berkalus. Pada minggu keempat, faktor tunggal maupun interaksinya tidak berpengaruh nyata terhadap semua variabel yang diamati (Tabel 1).

Tabel 1. Rekapitulasi hasil sidik ragam perlakuan prakultur tunas pepaya ‘Sukma’ terhadap konsentrasi sukrosa pada media MS dan lama prakultur (*Recapitulation of analysis of variance for papaya ‘Sukma’ shoot preculture treatment on concentration of sucrose in MS media and preculture time*).

Sumber Keragaman (<i>Source of Variation</i>)	Nilai P pada pengamatan minggu ke- (<i>P-value at observation week</i>)			
	1	2	3	4
Eksplan yang hidup (<i>living explant</i>) (%)				
Lama prakultur (<i>preculture time</i>) (L)	-	-	-	-
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>) (K)	-	-	-	-
L*K	-	-	-	-
Eksplan bertunas (<i>shooting explants</i>) (%)				
Lama prakultur (<i>preculture time</i>) (L)	0,13 ^{tn}	0,12 ^{tn}	-	-
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>) (K)	0,13 ^{tn}	0,02*	-	-
L*K	0,63 ^{tn}	0,08 ^{tn}	-	-
Eksplan berkalus (<i>callusing explants</i>) (%)				
Lama prakultur (<i>preculture time</i>) (L)	0,00**	0,00**	0,01*	0,71 ^{tn}
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>) (K)	0,69 ^{tn}	0,24 ^{tn}	0,25 ^{tn}	0,51 ^{tn}
L*K	0,00**	0,06 ^{tn}	0,21 ^{tn}	0,47 ^{tn}
Jumlah daun (<i>number of leaves</i>) (helai/sheet)				
Lama prakultur (<i>preculture time</i>) (L)	0,00**	0,07 ^{tn}	0,67 ^{tn}	0,35 ^{tn}
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>) (K)	0,39 ^{tn}	0,25 ^{tn}	0,73 ^{tn}	0,90 ^{tn}
L*K	0,11 ^{tn}	0,03*	0,05 ^{tn}	0,05 ^{tn}

Keterangan: * = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 5%, ** = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 1%, tn = sumber keragaman tidak berpengaruh nyata pada α 1% dan 5%, - = tidak terdapat keragaman pada variabel pengamatan (* = *source of varian significantly effect on α 5%*, ** = *source of varian significantly effect on α 1%*, tn = *source of variance did not significantly effect on α 1% and 5%*, - = *there was no variance in observed variable*).

Interaksi antara lama prakultur dan konsentrasi sukrosa tidak berpengaruh nyata terhadap semua variabel yang diamati pada minggu keempat (Tabel 2). Terdapat kecenderungan bahwa semakin tinggi taraf sukrosa, semakin tinggi pula daya tumbuh kultur. Jaringan tunas pepaya ‘Sukma’ terbukti toleran terhadap sukrosa dengan konsentrasi tinggi karena memiliki daya hidup 100% pada semua perlakuan prakultur hingga pengamatan minggu keempat. Eksplan mulai bertunas pada pengamatan minggu pertama dan daun baru mulai muncul pada pengamatan minggu kedua.

Pada variable jumlah daun, perlakuan sukrosa 0,3 M selama 3 hari merupakan perlakuan terbaik (Tabel 2). Hal ini tergambarkan pada hasil pengamatan minggu kedua bahwa jumlah daun terbanyak dan persentase eksplan berkalus terkecil adalah eksplan dengan perlakuan sukrosa 0,3 M selama 3 hari. Meskipun pada minggu keempat, persentase eksplan berkalus sama pada semua perlakuan, yaitu 100%. Dengan demikian, perlakuan sukrosa 0,3 M selama 3 hari diterapkan pada tahap penelitian selanjutnya.

Tabel 2. Pertumbuhan tunas pepaya ‘Sukma’ pada minggu keempat setelah perlakuan prakultur dalam sukrosa 0,3 M dan 0,4 M selama 1, 2, dan 3 hari (*Shoot of papaya ‘Sukma’ growth on 4th week after preculture treatment in 0.3 M and 0.4 M sucrose for 1, 2, and 3 days*).

Perlakuan (<i>treatment</i>)	Lama prakultur (<i>preculture time</i>) (hari/ <i>days</i>)		
	1	2	3
Eksplan yang hidup (<i>living explants</i>)(%)			
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>)			
0,3 M	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00
0,4 M	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00
Eksplan bertunas (<i>shooting explants</i>) (%)			
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>)			
0,3 M	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00
0,4 M	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00	100,0 ± 0,00
Eksplan berkalus (<i>callusing explants</i>) (%)			
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>)			
0,3 M	20,0 ± 20,0	17,8 ± 16,8	33,3 ± 23,1
0,4 M	26,7 ± 11,6	13,3 ± 11,5	13,3 ± 23,1
Jumlah daun (<i>number of leaves</i>) (helai/ <i>sheets</i>)			
Konsentrasi sukrosa (<i>concentration of sucrose</i>)			
0,3 M	3,5 ± 1,0 ^{ab}	1,4 ± 0,7 ^b	4,9 ± 2,5 ^a
0,4 M	3,3 ± 1,4 ^{ab}	3,6 ± 1,3 ^{ab}	2,6 ± 2,6 ^{ab}

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada variabel yang sama adalah berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%. (*Numbers followed by different letter on the same variable were significantly different at DMRT α 5%*).

Optimasi lama perlakuan *Loading* tunas pepaya ‘Sukma’ sebelum kriopreservasi

Hasil optimasi perlakuan *loading* menunjukkan bahwa lama *loading* berpengaruh nyata pada minggu ketiga dan keempat terhadap jumlah tunas dan jumlah daun eksplan (Tabel 3). Eksplan dapat

tumbuh 100% pada semua lama *loading* yang diujikan (Tabel 4). Lama *loading* terbaik dalam percobaan adalah 20–30 menit karena membentuk tunas dan daun terbanyak. Oleh karena itu, lama *loading* yang digunakan dalam percobaan selanjutnya adalah 30 menit.

Tabel 3. Rekapitulasi hasil sidik ragam perlakuan *loading* tunas pepaya ‘Sukma’ pada pengamatan minggu pertama sampai minggu keempat (*Recapitulation of analysis of variance for papaya ‘Sukma’ shoot loading treatment on 1st until 4th week observation*)

Variabel amatan (<i>variable of observation</i>)	Nilai P pada pengamatan minggu ke- (<i>P-value at observation week</i>)			
	1	2	3	4
Eksplan yang hidup (<i>living explant</i>) (%)	-	-	-	-
Jumlah tunas (<i>number of shoots</i>) (buah/ <i>pieces</i>)	0,67 ^{tn}	0,67 ^{tn}	0,02*	0,05 ^{tn}
Ekplan berkalus (<i>callusing explant</i>) (%)	-	0,44 ^{tn}	0,61 ^{tn}	0,63 ^{tn}
Jumlah daun (<i>number of leaves</i>) (helai/ <i>sheets</i>)	0,36 ^{tn}	0,19 ^{tn}	0,01*	0,01*

Keterangan: * = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 5%, ** = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 1%, tn = sumber keragaman tidak berpengaruh nyata pada α 1% dan 5%, - = variabel pengamatan memiliki keragaman yang sama (* = *source of varian significantly effect on α 5%*, ** = *source of varian significantly effect on α 1%*, tn = *source of variance did not significantly effect on α 1% and 5%*, - = *there was no variance in observed variable*).

Tabel 4. Pertumbuhan eksplan pepaya 'Sukma' setelah perlakuan *loading* pada minggu keempat (*Growth of 'Sukma' papaya explants after loading treatment in the fourth week*)

Lama <i>loading</i> (<i>loading time</i>) (menit/minutes)	Eksplan yang hidup (<i>living explant</i>) (%)	Jumlah tunas/eksplan (<i>number of shoots/ explant</i>) (pieces)	Jumlah daun/eksplan (<i>number of leaves/ eksplan</i>) (helai/ sheets)	Eksplan berkalus (<i>callusing explant</i>) (%)
0	100,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1 ^c	3,8 ± 0,4 ^b	68,0 ± 46,0
10	100,0 ± 0,0	1,4 ± 0,3 ^{bc}	4,3 ± 0,7 ^b	68,0 ± 46,0
20	100,0 ± 0,0	1,6 ± 0,4 ^{ab}	5,8 ± 1,1 ^a	100,0 ± 0,0
30	100,0 ± 0,0	1,9 ± 0,5 ^a	6,3 ± 0,8 ^a	100,0 ± 0,0

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada kolom yang sama adalah berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%. (*Numbers followed by different letter on the same variable were significantly different at DMRT α 5%*).

Dehidrasi dan pembekuan tunas pepaya 'Sukma' dalam nitrogen cair

Jenis krioprotektan, lama perendaman, dan interaksinya berpengaruh nyata pada daya tumbuh eksplan tanpa disimpan dalam nitrogen cair (Tabel 5). Hal ini menunjukkan bahwa dehidrasi dengan perlakuan krioprotektan pada eksplan pepaya 'Sukma' tidak membuat sel menjadi mati sebelum disimpan dalam nitrogen cair. Perlakuan dehidrasi terbaik adalah eksplan yang direndam dengan modifikasi PVS2 selama 10 menit, karena tanpa

disimpan dalam nitrogen cair, eksplan memiliki daya hidup 100%, jumlah tunas dan jumlah daun tertinggi (2,67 dan 7,67) (Tabel 6). Namun demikian, eksplan dengan perlakuan tersebut tidak mampu tumbuh kembali setelah disimpan dalam nitrogen cair. Eksplan berubah warna menjadi putih (Gambar 1.e.) setelah tiga hari ditanam pada media regenerasi dan belum ditemukan tanda-tanda bahwa eksplan mampu tumbuh kembali setelah 8 minggu. Hal serupa juga dialami oleh eksplan dengan perlakuan dehidrasi lain.

Tabel 5. Rekapitulasi hasil sidik ragam perlakuan dehidrasi tunas pepaya 'Sukma' pada pengamatan minggu pertama sampai minggu keempat sebelum disimpan dalam nitrogen cair. (*Analysis of variance recapitulation of or papaya 'Sukma' shoot dehydration treatment on observations from the first week to the fourth week before stored in liquid nitrogen*)

Sumber keragaman (<i>source of variation</i>)	Nilai P pada pengamatan minggu ke- (<i>P-value at observation week</i>)			
	1	2	3	4
Eksplan yang hidup (<i>living explant</i>) (%)				
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>) (K)	0,06 ^{tn}	0,03*	0,03*	0,03*
Lama Perendaman (<i>loading time</i>) (L)	0,11 ^{tn}	0,26 ^{tn}	0,26 ^{tn}	0,33 ^{tn}
K*L	0,11 ^{tn}	0,26 ^{tn}	0,26 ^{tn}	0,33 ^{tn}
Eksplan berkalus (<i>callusing explant</i>) (%)				
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>) (K)	0,00**	0,00**	0,00**	0,00**
Lama Perendaman (<i>loading time</i>) (L)	0,01*	0,31 ^{tn}	0,00**	0,00**
K*L	0,90 ^{tn}	0,17 ^{tn}	0,01*	0,04*
Jumlah tunas (<i>number of shoots</i>) (buah/pieces)				
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>) (K)	0,01*	0,11 ^{tn}	0,10 ^{tn}	0,11 ^{tn}
Lama Perendaman (<i>loading time</i>) (L)	0,00**	0,25 ^{tn}	0,15 ^{tn}	0,32 ^{tn}
K*L	0,04*	0,58 ^{tn}	0,46 ^{tn}	0,69 ^{tn}
Jumlah daun (<i>number of leaves</i>) (helai/sheets)				
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>) (K)	0,14 ^{tn}	0,00**	0,00**	0,00**
Lama Perendaman (<i>loading time</i>) (L)	0,00**	0,00**	0,02*	0,08 ^{tn}
K*L	0,05 ^{tn}	0,15 ^{tn}	0,16 ^{tn}	0,21 ^{tn}

Keterangan: * = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 5%, ** = sumber keragaman berpengaruh nyata pada α 1%, tn = sumber keragaman tidak berpengaruh nyata pada α 1% dan 5% (* = source of variance significantly effect on α 5%, ** = source of variance significantly effect on α 1%, tn = source of variance did not significantly effect on α 1% and 5%, - = there was no variance in observed variable).

Tabel 6. Pertumbuhan tunas pepaya ‘Sukma’ setelah dehidrasi, tanpa pembekuan dan dengan pembekuan dalam nitrogen cair pada pengamatan minggu keempat (*Growth of ‘Sukma’ papaya shoots after dehydration, without freezing and freezing in liquid nitrogen at the fourth week of observation*)

Perlakuan (<i>treatment</i>)	Lama perendaman dalam krioprotektan (<i>immersion time in cryoprotectant</i>) (menit/ <i>minutes</i>)					
	5		10		15	
	-N ₂	+N ₂	-N ₂	+N ₂	-N ₂	+N ₂
Eksplan yang hidup (<i>living explant</i>) (%)						
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>)						
PVS2	50,0 ± 50,0 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	75,0 ± 25,0 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^c	91,7 ± 14,4 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^c
Modifikasi PVS2 (<i>modification of PVS2</i>)	100,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^c
Eksplan berkalus (<i>callusing explant</i>) (%)						
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>)						
PVS2	25,0 ± 43,3 ^{bc}	0,0 ± 0,0 ^c	16,7 ± 28,9 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
Modifikasi PVS2 (<i>modification of PVS2</i>)	66,7 ± 28,9 ^{ab}	0,0 ± 0,0 ^c	100,0 ± 0,0 ^a	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c	0,0 ± 0,0 ^c
Jumlah tunas (<i>number of shoots</i>) (buah/ <i>pieces</i>)						
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>)						
PVS2	0,8 ± 0,7 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	1,3 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	1,2 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^b
Modifikasi PVS2 (<i>modification of PVS2</i>)	1,4 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	2,7 ± 2,1 ^a	0,0 ± 0,0 ^b	1,7 ± 0,4 ^a	0,0 ± 0,0 ^b
Jumlah daun (<i>number of leaves</i>) (helai/ <i>sheets</i>)						
Krioprotektan (<i>cryoprotectant</i>)						
PVS2	1,3 ± 1,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	2,4 ± 1,2 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	2,6 ± 0,5 ^b	0,0 ± 0,0 ^c
Modifikasi PVS2 (<i>modification of PVS2</i>)	4,0 ± 0,2 ^b	0,0 ± 0,0 ^c	7,7 ± 3,5 ^a	0,0 ± 0,0 ^c	4,3 ± 1,1 ^b	0,0 ± 0,0 ^c

Keterangan: Angka-angka yang diikuti oleh huruf yang berbeda pada setiap variabel dan tahapan yang sama adalah berbeda nyata pada uji DMRT taraf 5%, PVS2= *plant vitrification solution-2*, -N₂ = eksplan tidak disimpan dalam nitrogen cair, +N₂ = eksplan disimpan dalam nitrogen cair. (Numbers followed by different letter on the same variable were significantly different at DMRT α 5%. PVS2= *plant vitrification solution-2*, -N₂ = *explant did not store in liquid nitrogen*, +N₂ = *explant stored in liquid nitrogen*.)



Gambar 1. Eksplan tunas pepaya ‘Sukma’, a) kontrol, b) 4 minggu setelah prakultur, c) 4 minggu setelah perlakuan *loading*, d) 4 minggu setelah dehidrasi, dan e) 3 hari setelah disimpan dalam nitrogen cair (Garis skala=5 mm) (*Papaya ‘Sukma’ shoot explant, a) control, b) 4 weeks after preculture, c) 4 weeks after loading, d) 4 weeks after dehydration, e) 3 days after stored in the liquid nitrogen*).

PEMBAHASAN

Pemberian perlakuan prakultur dan *loading* merupakan salah satu solusi agar sel dan jaringan tanaman dapat beradaptasi dengan baik di setiap tahapan kriopreservasi. Hasil percobaan menunjukkan bahwa prakultur memberikan pengaruh terhadap pertambahan jumlah daun pada eksplan. Hal inimenunjukkan bahwa prakultur dapat membuat selberadaptasi dengan krioprotektan sehingga sel akan mampu bertahan pada saat proses pembekuan dan pelelehan. Normah *et al.* (2019) menyatakan pula bahwa tanaman tropika lebih membutuhkan perlakuan yang dapat menginduksi toleransi terhadap temperatur yang sangat rendah karena memiliki lingkungan hidup yang cukup hangat.

Feng *et al.* (2012) menyatakan bahwa prakultur dengan menggunakan media yang diperkaya sukrosa dengan konsentrasi tinggi menyebabkan kandungan gula endogen pada eksplan menjadi meningkat. Kandungan gula yang tinggi ini akan berkorelasi positif terhadap daya tumbuh eksplan setelah kriopreservasi. Falgado *et al.* (2014) menyebutkan pula bahwa sukrosa merupakan metabolit penting yang dibutuhkan pada berbagai lintasan sel pada tanaman yang menyebabkan tanaman memiliki adaptasi yang baik terhadap dingin dan stress dehidrasi. Hal ini juga sesuai dengan hasil dalam percobaan yang menunjukkan bahwa persentase eksplan bertunas dan jumlah daun semakin banyak seiring dengan lama prakultur (Tabel 2).

Selain prakultur, perlakuan *loading* juga merupakan salah satu perlakuan yang dibutuhkan sel dan jaringan sebelum kriopreservasi. Hasil pada percobaan ini juga memperlihatkan bahwa *loading* memberikan pengaruh yang baik terhadap pertumbuhan eksplan. Tsai *et al.* (2009) melaporkan bahwa dayahidup tunas pucuk pepaya yang diberikan perlakuan *loading* memiliki daya hidup kembali 90% setelah kriopreservasi. Kim *et al.* (2009) menyatakan pula bahwa larutan *loading* di dalam sel memiliki peranan sebagai penetral stress osmotik dan menginduksi adaptasi sel dan jaringan selama proses dehidrasi dan pembekuan dalam nitrogen cair. Hal yang sama juga disampaikan oleh Roostika *et al.* (2007) bahwa perlakuan *loading* dapat meningkatkan osmo toleransi jaringan sehingga dapat beradaptasi pada larutan dengan konsentrasi yang lebih tinggi (krioprotektan). *Loading* dapat meningkatkan fleksibilitas membrane sel dan menyebabkan proses dehidrasi berjalan perlahan sehingga sel tidak pecah.

Eksplan tidak mampu tumbuh setelah kriopreservasi diduga akibat sel eksplan kurang terdehidrasi oleh krioprotektan sehingga masih ada air di dalam sel yang menyebabkan terbentuknya kristal es, baik

intra seluler maupun ekstraseluler (Berjak dan Pammenter, 2014). Kristal es ini dapat merusak sel sehingga menyebabkan kematian sel. Kerusakan sel di akibatkan oleh daya mekanis kristal es yang terus tumbuh, gaya adhesi kristal es terhadap membran, serta interaksi elektrik yang disebabkan oleh perbedaan solubilitas ion pada fase es dan cair, formasi gelembung udara intra seluler, luka kimiawi yang berhubungan peroksidase lipid, dan perubahan pH (Kaczmarczyk *et al.*, 2012). Krioprotektan yang bekerja optimal akan memelihara keutuhan membrane sel dengan cara bereaksi dengan ikatan hidrogen pada air sehingga meningkatkan viskositas sel seiring turunnya suhu penyimpanan. Viskositas sel ini akan mempengaruhi pergerakan dan pertumbuhan kristal es di dalam sel (Elliot *et al.*, 2017).

Pembekuan cepat dan *thawing* adalah tahap paling kritis pada percobaan ini. Eksplan memutih setelah ditumbuhkan pada media regenerasi akibat proses vitrifikasi atau proses pendinginan sangat cepat di dalam nitrogen cair. Vitrifikasi adalah proses perubahan fase transisi air dari bentuk cairmenjadi bentuk non kristalin atau amorf, tembus pandang (*glassy*) karena elevasi ekstrim dari larutan yang viskos selama pendinginan (Elliot *et al.*, 2017). Pada saat *thawing*, terjadi kontraksi osmotik yang dapat menyebabkan terbentuknya membrane sel baru sebagai upayape mulihan sel. Proses terbentuknya membrane sel ini *irreversible* sehingga menyebabkan sel menjadi lisis, karena bahan membran yang baru tidak mampu memfalisitasi proses deplasmolisis (Kaczmarczyk *et al.*, 2012).

Selain itu, berdasarkan hasil dari percobaan, diduga bahwa PVS2 bersifat lebih toksik dibandingkan modifikasi PVS2 karena PVS2 memiliki kandungan gliserol dan DMSO yang lebih tinggi dibandingkan modifikasi PVS2. Gliserol dan DMSO adalah krioprotektan yang dapat menembus sel dan berinteraksi dengan ujung polar dari fosfolipid pada membrane sel sehingga membrane sel menjadi lebih stabil saat disimpan dalam nitrogen cair (Elliot *et al.*, 2017). Akan tetapi, gliserol dan DMSO dapat bersifat toksik bila diberikan dengan konsentrasi yang tinggi. Hal ini sesuai dengan penelitian, Cho *et al.* (2002) bahwa embrio *Citrusmadurensis* yang didehidrasi dengan krioprotektan yang mengandung 30% gliserol dan 15% DMSO memiliki daya tumbuh yang lebih rendah dibandingkan dengan krioprotektan yang mengandung 15% gliserol dan 7,5% DMSO. Markovic *et al.* (2013) melaporkan pula bahwa tunas apical *Vitis vinifera* L. yang didehidrasi dengan PVS3 (konsentrasi gliserol 50%) tidak mampu tumbuh kembali, sedangkan yang didehidrasi dengan PVS2 (konsentrasi gliserol 30%) mampu tumbuh kembali dengan persentase 40%.

Pada modifikasi PVS2, selain konsentrasi gliserol dan DMSO yang lebih rendah, kandungan asam amino berupa prolin membuat modifikasi PVS2 kurang toksik dibandingkan dengan PVS2. Prolin sebagai krioprotektan berfungsi dalam menjaga integrasi sel. Selain itu, *prolin* juga digunakan sebagai sumber nitrogen dan karbon, *osmolit* yang kompatibel, bufer pH *sitosolik*, pengikat *reactive oxygen species (ROS)*, membantu menyeimbangkan status redoks seluler, *molecular chaperone*, membantu menstabilkan struktur protein, merupakan bagian dari siklus sinyal transduksi sel tanaman yang mengindikasikan adanya stres, dan meningkatkan respon adaptif tanaman terhadap lingkungan (Burritt, 2012).

Hasil percobaan lain menyatakan bahwa tunas pepaya mampu tumbuh kembali setelah kriopreservasi. Azimi *et al.* (2005) telah melakukan kriopreservasi tunas pucuk pepaya ‘Queensland’ dengan merendamnya pada 100% PVS2 selama 20 menit pada suhu 0°C kemudian disimpan dalam nitrogen cair. Tunas tersebut mampu tumbuh kembali sebesar 70%. Kriopreservasi dengan eksplan tunas pucuk juga telah dilakukan oleh Silva (2014). Silva (2014) menggunakan 2 varietas pepaya yaitu Rainbow dan Sunrise Solo dan menggunakan bahan material berupa eksplan kalus kompak (*hard callus*), kalus embrio genik, dan jaringan daun. Metode kriopreservasi yang digunakan adalah *encapsulation dehydration*. Hasil menunjukkan bahwa kriopreservasi berhasil dilakukan karena eksplan dapat beregenerasi kembali pada media yang optimal serta dapat diaklimatisasi.

Kriopreservasi tunas pepaya ‘Sukma’ belum berhasil dilakukan dengan penambahan tahapan prakultur, *loading* dan penggunaan modifikasi PVS2 sebagai krioprotektan. Meskipun begitu, kriopreservasi pepaya ‘Sukma’ masih harus tetap dilakukan dengan modifikasi protokol yang berbeda dari sebelumnya. Menurut Normah *et al.* (2019) setiap jenis tanaman dengan genotipe yang berbeda memiliki tahapan kriopreservasi spesifik yang berbeda dengan genotipe lainnya. Selain itu, penggunaan eksplan berupa jaringan meristem juga dapat memberikan tingkat pertumbuhan yang baik setelah kriopreservasi (Dhekney *et al.*, 2016). Jaringan meristem terdiri dari sel-sel yang memiliki sitoplasma rapat, vakuola kecil, dan kestabilan genetik yang tinggi bila diperbanyak secara klonal sehingga memiliki daya tahan hidup yang lebih baik pada saat dikriopreservasi (Normah *et al.*, 2019). Normah *et al.* (2019) menyebutkan pula bahwa umur dan ukuran eksplan sangat berpengaruh terhadap tingkat keberhasilan kriopreservasi. Eksplan tunas yang memiliki vigor yang bagus adalah tunas *in vitro* yang berumur 2–8 minggu dari subkultur. Ukuran eksplan merupakan salah satu faktor penting dalam kriopreservasi

karena berpengaruh terhadap kemampuan tumbuh pasca kriopreservasi. Ukuran eksplan yang baik adalah berkisar antara 0,5–3 mm (Normah *et al.*, 2019).

KESIMPULAN

Perlakuan prakultur terbaik adalah mengkulturkan eksplan pada media MS dengan konsentrasi sukrosa 0,3 M selama 3 hari. Lama *loading* terbaik adalah perendaman dalam larutan *loading* (MS cair + sukrosa 1,2 M) selama 20–30 menit. Krioprotektan dengan dehidrasi terbaik adalah modifikasi PVS2 selama 10 menit. Kriopreservasi pepaya ‘Sukma’ belum berhasil karena eksplan tidak mampu tumbuh setelah disimpan dalam nitrogen cair. Percobaan ini merupakan salah satu tahap awal kriopreservasi pepaya ‘Sukma’ sehingga hasil-hasilnya dapat menjadi informasi yang penting dalam percobaan selanjutnya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada Lembaga Pengelola Dana Pendidikan Kementerian Keuangan RI yang telah membiayai percobaan ini dan kepada Pusat Kajian Hortikultura Tropika IPB yang telah memberikan izin kepada penulis untuk menggunakan bahan dan alat percobaan dalam laboratorium. Penulis yang menjadi kontributor utama dalam KTI ini adalah Fitri Fatma Wardani, sedangkan penulis lainnya menjadi kontributor anggota.

DAFTAR PUSTAKA

- Al-Shara, B., Taha, R.M. and Rashid, K., 2018. Biotechnological methods and limitations of micropropagation in papaya (*Carica papaya* L.) production. *The Journal of Animal and Plant Science*, 28 (5), pp.1208–1226.
- Azimi, M., Brien, C., Ashmore, S. and Drew, R., 2005. Cryopreservation of Papaya Germplasm. *Proceeding 11th IS on Biotechnology of Tropical and Subtropical Species Acta Horticultura*, 692, pp.43–50.
- Berjak, P. and Pammenter N.W., 2014. Cryostorage of germplasm of tropical recalcitrant seeded species: approaches and problems. *International Journal of Plant Sciences*, 175, pp. 29–39.
- Burritt, D.J., 2012. Proline and the cryopreservation of plant tissues: functions and practical applications, current frontiers in cryopreservation. In Katkov, I.ed. *Current Frontiers in Cryobiology*. pp.415–430. InTech. Rijeka.
- Cho, E.G., Hor, Y.L., Kim, H.H., Rao, V.R. and Engelmann, F., 2002. Cryopreservation of *Citrus madurensis* embryonic axes by vitrification: importance of loading and treatment with vitrification solution. *Cryo Letters*, 23, pp.317–324.
- Dhekney, S.A., Kandel, R., Bergey, D.R., Sittler, V., Soorianathasundaram, K. and Litz, R.E., 2016. Advances in papaya biotechnology. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 5, pp.133–142.
- Elliot, G.D., Wang, S. and Fuller, B.J., 2017. Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures. *Cryobiology*, 76, pp.74–91.
- Folgado, R., Sergeant, K., Renaut, J., Swennen, R., Hausman, J.F. and Panis, B., 2014. Changes in sugar content and proteome in response to cold and dehydration stress and

- their implication for cryopreservation, *Journal of Proteome Research*, 98, pp. 99–111.
- Feng, C.H., Cui, Z.H., Li, B.Q., Chen, L., Ma, Y.L., Zhao, Y.H. and Wang, Q.C., 2012. Duration of sucrose preculture is critical for shoot regrowth of in vitro-grown apple shoot-tips cryopreserved by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. DOI: 10.1007/s11240-012-0245-3.
- Hervani, D., Efendi, D., Suhartanto, M.R. and Purwoko, B.S., 2016. Mempertahankan genetik plasma nutfah tanaman pepaya (*Carica papaya* L.) secara kriopreservasi. *Prosiding Seminar Nasional Perhorti dan Peragi*, Makasar, pp. 33–36.
- Hervani, D., Efendi, D., Suhartanto, M.R. and Purwoko, B.S., 2018. The preservation of somatic embryos of papaya derived from papaya lateral shoots after being stored in cryopreservation to maintain plant genetic information in the future. *Biodiversitas*, 19(3), pp.774–779.
- Kaczmarczyk, A., Bryn, F., Menon, A., Phang, P.Y., Al-Hanbali, A., Bunn, E. and Mancera, L.R., 2012. Current issues in plant cryopreservation. In I. Katkov. Ed. *Current Frontiers in Cryobiology*. pp.417–438. InTech. Rijeka
- Keputusan Menteri Pertanian Nomor 509. 2009. *Deskripsi Pepaya Varietas Sukma*. SK No.509/Kpts/SR.120/10/2009
- Kim, H.H., Lee, Y.G., Park, S.U., Lee, S.C., Baek, H.J., Cho, E.G. and Engelmann, F., 2009. Development of alternative loading solution in droplet-vitrification procedures. *Cryo Letters*, 30(3), pp.291–299.
- Markovic, Z., Chatelet, P., Sylvestre, I., Kontic, J.K. and Engelmann, F., 2013. Cryopreservation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) in vitro shoot tips. *Central European Journal of Biology*, 8(10), pp.993–1000. doi: 10.2478/a11535-013-0223-8.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum*, 15, pp.473–497.
- Normah, M.N., Sulong, N. and Reed, B.M., 2019. Cryopreservation of shoot tips of recalcitrant and tropical species: Advance and strategies, *Cryobiology*, 87, pp. 1–14.
- Nwofia, G.E., Ojmelukwe, P. and Eji, C., 2012. Chemical composition of leaves, fruit pulp and seeds in some *Carica papaya* (L) morphotypes. *International Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 2(1), pp.200–206.
- Pritchard, H.W., Nadarajan, J., Ballesteros, D., Thammasiri, K., Prasongsom, S., Malik, S.K., Chaudhury, R., Kim, H.H., Lin, L., Li, W.Q., Yang, X.Y. and Popova, E., 2017. Cryobiotechnology of tropical seeds—scale, scope and hope. *Proceeding I International Symposium on Tropical and Subtropical Ornamentals*, 1167, pp. 37–47, DOI 10.17660/ActaHortic.2017.1167.6
- Roostika, I., Darwati, I. dan Megia, R., 2007. Kriopreservasi tanaman purwoceng (*Pimpinella pruatjan* Molck.) dengan teknik vitrifikasi. *Berita Biologi*, 8(6), pp.423–431.
- Sakai, A., Kobayashi, S. and Oiyama, I., 1991. Cryopreservation of nucellar cells of navel orange (*Citrus sinensis* Osb.) by a simple freezing method. *Plant Science*, 74, pp.243–248.
- Silva, J.A.T., 2014. Callus induction in papaya (*Carica papaya* L.) and synseed production for low temperature storage and cryopreservation. *Folia Horticulturae*, 26(2), pp.155–162. DOI: 10.1515/fhort-2015-0007.
- Tsai, S.F., Yeh, S.D., Chan, C.F., and Liaw, S.I., 2009. High-efficiency vitrification protocols for cryopreservation of in vitro grown shoot tips of transgenic papaya lines. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 98(2), pp.157–164.
- Wang, Y.L., Fab, M.J., and Liaw, S.I., 2005. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of papaya (*Carica papaya* L.) by vitrification. *Botany Bulletin Academy Singapore*, 46, pp.29–34.